

文章编号:1005-6947(2008)06-0566-04

· 基础研究 ·

溶栓抗凝联合治疗对大鼠急性血栓后血管内膜的影响

杨冰¹, 赵庆华¹, 赵渝², 王学虎², 向东洲²

(重庆大学附属第一医院 1. 护理部 2. 血管外科, 重庆 400016)

摘要:目的 观察溶栓抗凝联合治疗对急性大鼠下腔静脉血栓形成后血管内膜的影响。方法 SD大鼠105只建立急性下腔静脉血栓模型后随机分为肝素治疗组(A组),尿激酶治疗组(B组),肝素加尿激酶联合治疗组(C组),各组35只;另30只为假手术组。各组给药后分别于血栓形成后第1,4,7,14,28天获取病变段血管,观察血栓的结构演变与机化、内膜增生程度,检测静脉壁平滑肌胶原沉积量,扫描电镜评估内皮细胞形态学变化。结果 A组内膜增生最严重。C组胶原染色面积百分比A,B组少($P < 0.01$)。7d时B,C组内皮损伤较A组轻($P < 0.05$)。28d时C组内皮损伤较A,B组轻($P < 0.05$)。结论 肝素加尿激酶治疗大鼠急性下腔静脉血栓形成具有良好的近、中期效果,能有效地保护内皮层完整,减轻血管壁肌纤维增生。 [中国普通外科杂志,2008,17(6):566-569]

关键词: 静脉血栓形成/治疗;血管内膜/病理学;抗凝;溶栓

中图分类号:R 654.4

文献标识码:A

Effect of combined thrombolysis and anticoagulation therapy on intimal changes of vein wall after acute thrombosis in rats

YANG Bing¹, ZHAO Qinghua¹, ZHAO Yu², WANG Xuehu², XIANG Dongzhou²

(1. Department of Nursing 2. Department of Vascular Surgery, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 400016 China)

Abstract: **Objective** To observe the intimal changes of inferior caval vein (ICV) wall after combined thrombolysis and anticoagulation therapy for acute thrombosis in rats. **Methods** The inferior caval venous thrombosis model was established in 105 rats and they were randomly divided into 3 treated groups: heparin (A) treatment group ($n = 35$), urokinase (B) treatment group ($n = 35$), and combination of urokinase and heparin (C) treatment group ($n = 35$), and also established a sham (D) group ($n = 30$). The thrombosed caval veins were taken 1, 4, 7, 14, and 28 d after thrombosis. Changes of thrombus structure and organization and intimal hyperplasia were observed by light microscope. The expression areas of collagen fiber were measured by histochemistry. Scanning electron microscopy was used to observe the damage of endothelial cells. **Results** The intimal hyperplasia in A group was the most severe. The expression area of collagen fiber in group C was less than that of A and B groups ($P < 0.01$). At 7 d, intimal injury in B and C groups was less than A group ($P < 0.05$). At 28 d, intimal injury in the C group was less than that in A and B groups ($P < 0.05$). **Conclusions** Combination of urokinase and heparin for the treatment of acute inferior caval venous thrombosis of rat has good short and mid-term effect. It effectively maintains the integrity of endothelium of vein wall and decreases the fibrocellular proliferation of the thrombosed vein.

[Chinese Journal of General Surgery, 2008, 17(6):566-569]

收稿日期:2008-03-31; 修订日期:2008-06-10。

作者简介:杨冰,女,重庆大学附属第一医院硕士研究生,主要从事静脉血栓方面的研究。

通讯作者:赵庆华 E-mail:qh20063@163.com

Key words: Venous Thrombosis/ther; Tunica Intima/pathol; Anticoagulation; Thrombolysis

CLC number: R 654.4

Document code: A

溶栓(thrombolysis, TL)和抗凝是治疗下肢深静脉血栓形成(deep venous thrombosis, DVT)的重要治疗方法之一。DVT虽可自然再通,但其再通静脉多表现为内膜增生、附壁血栓纤维化等征象,并产生明显的血流动力学改变。本实验通过病理学检查来综合比较分别应用肝素、尿激酶及尿激酶加肝素联合治疗后,病变血管段静脉壁形态学变化,探讨溶栓、抗凝对静脉血栓形成治疗的病理学基础,以及血管内皮细胞功能变化与形态学的关系。

1 材料和方法

1.1 动物分组

135只雄性SD大鼠(体重180~200g,重庆医科大学动物实验中心提供),随机分为肝素治疗组(A组),尿激酶治疗组(B组),尿激酶加肝素治疗组(C组),各35只;另30只为假手术组(S组)作为对照。其中A,B,C组再分为术后第1,4,7,14,28d天5个时相亚组,每个亚组段7只大鼠。

1.2 急性下腔静脉血栓形成模型的制作

2%苯巴比妥钠40mg/kg腹腔麻醉,游离左肾静脉与下腔静脉汇合处和髂总静脉分叉处之间的下腔静脉段。分别在左肾静脉下腔静脉处汇合处下方用1#丝线结扎下腔静脉,在髂总静脉分叉处上方用显微血管夹暂时阻断下腔静脉1h,经25G细针穿刺无血液流出,证实该段静脉内血栓已形成。血栓形成模型制作成功率为98%。对照组只显露腔静脉但不结扎。

1.3 药物治疗

成功建模后,A,B,C组分别给予尾静脉注入肝素钠200U/kg,尿激酶20000U/kg,尿激酶20000U/kg+肝素150U/kg。S组给予相同容量的生理盐水。每天1次,共10d。

1.4 观察指标

分别于术后的第1,4,7,14,28天,切除血栓形成的下腔静脉段,于血管中间切断,其中一段纵行剪开管壁,去除血栓,分别固定于10%甲醛溶液和25%戊二醛中。HE染色观察:血栓的结构演变与机化程度(10×40倍),内膜增生(intimal hyperplasia, IH);Masson三色染色观察胶原纤维沉积情况,通过IMS计算机彩色图像分析系统采集数据,以 $\bar{x} \pm s$ 标准差作为样本数据。扫描电镜(HITACHI, S520, 日本)下行内皮损伤分级^[1], I级:内皮细胞脱落0~10%,内皮层完整×1000; II级:内皮细胞脱落11%~25%,内皮层轻微断裂伴白细胞及血小板沉积×1000; III级:内皮细胞脱落26%~50%,片状内皮脱落,明显的内皮下基质显露×1000; IV级:内皮细胞脱落51%~75%,内皮肿胀伴明显组织坏死×1000; V级:内皮细胞脱落76%~100%,严重的内皮脱落伴明显的内皮下基质暴露×1000(图1)。

1.5 统计学处理

内皮层损伤分级以等级资料表示,采用多个样本两两比较的秩和检验。胶原纤维染色面积百分比采用多个样本均数间的两两比较的方差分析。

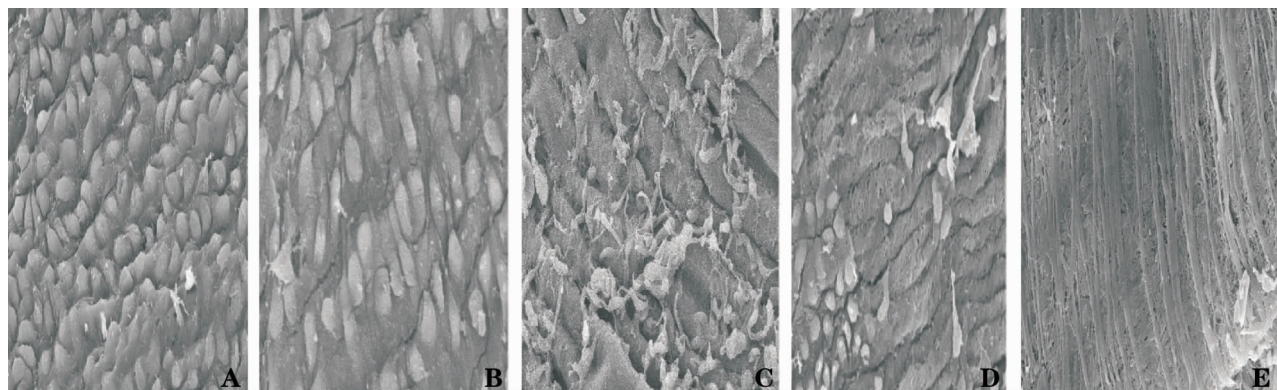


图1 电镜下内皮损伤分级 A:I级;B:II级;C:III级;D:IV级;E:V级

2 结果

2.1 光镜下病理检查结果

2.1.1 腔静脉 IH 检测结果 S 组未见明显 IH。7 d 时 A, B 组 IH 较重, C 组 7 条腔静脉未见明显 IH; 14 d 时 A 组 IH 严重, B 组较重, C 组较轻; 28 d 时与 A, B 组比较, C 组较轻, 其中 A 组第 28 天仍保持较高水平(图 2)。

2.1.2 股静脉壁胶原沉积检测结果 与 C 组比较, A, B 组分别于第 7, 10 天已有明显胶原纤维沉积, 其中 A 组第 28 天仍保持较高水平; C 组纤维沉积较轻(表 1)。S 组未见明显胶原沉积。

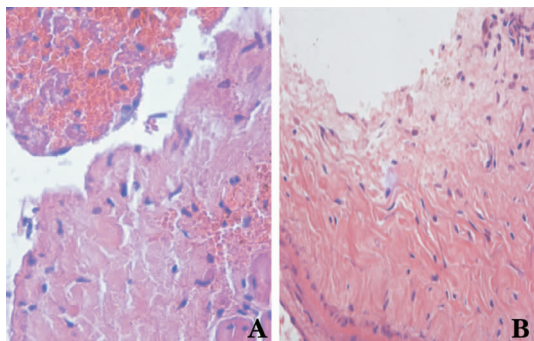


图 2 股静脉内膜增生情况 A: C 组 7 d 时轻度内膜增生(HE × 100); B: A 组 7 d 时重度内膜增生(HE × 100)

表 1 各组在治疗后 5 个时相胶原纤维染色面积比较(% , $\bar{x} \pm s$)

组别	静脉数(条)	胶原蛋白表达面积				
		1 d	4 d	7 d	14 d	28 d
A	7	16.5 ± 5.2 ⁴⁾	22.4 ± 5.5 ^{2),3),4)}	28.8 ± 6.2 ^{2),3),4)}	37.8 ± 7.6 ^{2),3),4)}	48.9 ± 8.8 ^{2),3),4)}
B	7	16.1 ± 4.4 ⁴⁾	18.9 ± 5.4 ⁴⁾	21.1 ± 5.6 ⁴⁾	27.5 ± 6.4 ^{1),4)}	37.4 ± 5.4 ^{1),4)}
C	7	16.2 ± 3.2 ⁴⁾	18.5 ± 4.6 ⁴⁾	20.7 ± 4.2 ⁴⁾	21.9 ± 5.8 ^{2),4)}	28.8 ± 6.2 ^{2),4)}
S	6	7.3 ± 2.1	8.1 ± 3.0	6.6 ± 3.2	7.8 ± 2.4	6.9 ± 3.6

注: 1)与 A 组比较, $P < 0.01$; 2)与 B 组比较, $P < 0.01$; 3)与 C 组比较, $P < 0.01$; 4)与 S 组比较, $P < 0.01$

2.2 腔静脉内皮细胞扫描电镜检查结果

实验干预各组及各时相点内皮细胞均有损伤。所有血栓形成的内皮(EC)形态均与正常对照存在明显差异。A 组 EC 损伤程度随血栓形成病程进行性增大, 1 d 时多为 I ~ II 级; 4, 7 d 时损伤加重, 28 d 时为 IV ~ V 级; B 组 1 d 时内皮层基本完整, 但溶栓后 EC 形态变为长条形, 细胞间隙略 EC 脱落, 细胞间隙增大, 内皮下基质暴露, 有血小板和白细胞黏附, 损伤多为 III ~ IV 级; 溶栓后 14, 28 d, EC 修复再生, 内皮形态渐趋规则, 但修复不完全, 仍可见内皮下基质暴露, 内皮损伤多为 II ~ III 级。C 组 1, 4, 7, 14 d 时 EC 形态变化与 B 组相似, 28 d 时, 内皮修复较好, 损伤多为 I ~ II 级。组间不同时相内皮损伤: A 组与 C 组比较, 在溶栓术后 7, 14, 28 d 差异有统计学意义($P < 0.05$); B 组与 C 组比较, 在治疗后 28 d 差异有统计学意义($P < 0.05$); A, B, C 组与 S 组比较, 在治疗后 4, 7, 14, 28 d, 差异均有显著性($P < 0.05$)(表 2-3)。

表 2 各组内皮损伤比较(n)

时间	分组	损伤分级					c	P
		I	II	III	IV	V		
1d	A	3	4	0	0	0	4.559	0.207
	B	4	3	0	0	0		
	C	4	2	1	0	0		
	S	6	0	0	0	0		
4d	A	0	3	2	2	0	14.939	0.002
	B	0	4	2	1	0		
	C	0	3	3	1	0		
	S	6	0	0	0	0		
7d	A	0	1	3	1	2	16.114	0.001
	B	0	2	4	1	0		
	C	0	3	3	1	0		
	S	6	0	0	0	0		
14d	A	0	0	2	3	2	19.337	0.000
	B	0	4	2	1	0		
	C	1	3	3	0	0		
	S	6	0	0	0	0		
28d	A	0	0	1	2	4	20.999	0.000
	B	0	2	3	1	1		
	C	2	4	1	0	0		
	S	6	0	0	0	0		

表3 组间不同时相内皮损伤比较

分组		1 d	4 d	7 d	14 d	28 d
A组 vs B组	Uab	-0.515	-0.625	-1.237	-2.515	-2.770
	P	0.606	0.532	0.216	0.012	0.006
A组 vs C组	Uac	-0.214	-0.274	-1.484	-2.839	-3.089
	P	0.830	0.784	0.038	0.005	0.002
A组 vs S组	Uad	-2.138	-3.185	-3.180	-3.185	-3.210
	P	0.101	0.001	0.001	0.001	0.001
B组 vs C组	Ubc	-0.218	-0.421	-0.421	-0.490	-2.291
	P	0.827	0.674	0.674	0.624	0.022
B组 vs S组	Ubd	-1.757	-3.210	-3.210	-3.210	-3.180
	P	0.234	0.001	0.001	0.001	0.001
C组 vs S组	Ucd	-1.743	-3.195	-3.195	-2.832	-2.488
	P	0.081	0.001	0.001	0.005	0.013

3 讨论

急性下肢深静脉血栓形成多用抗凝、溶栓及外科取栓来治疗。据文献报道,抗凝、溶栓较之外科取栓有更好的内皮结构保护作用^[2-3]。而EC在血栓形成、复发的过程中具有重要作用^[4-5];EC能释放一氧化氮(nitric oxide, NO)、内皮素(endorhelin, ET)、前列环素(prostacyclin, PGI₂)及血小板合成的血栓素(thromboxane, TXA)等血管活性物质,有调节血管的舒缩和血管壁的结构及保护抗血栓的内膜表面的作用。内皮还是炎症和免疫反应的介导者及调节者。内皮通过产生促生长因子及抑制生长因子调整细胞外基质的成分来调节血管壁的结构。内皮细胞在抑制平滑肌细胞(smooth muscle cell, SMC)生长及从中膜到内膜的移行中起着重要作用;内皮细胞能够合成抑制SMC生长的类肝素样物质^[6]。当内皮细胞受损将会失去其抗血栓作用而导致炎症反应等^[7-8]。因此在血栓形成的治疗中,保护血管内皮细胞便成为治疗成功与否的焦点。

急性静脉血栓时,血栓中纤维蛋白和纤维蛋白原结合了大量被激活的凝血酶,这种凝血酶不易被肝素所灭活,而在血栓局部发挥持久的生物活性作用,刺激其特异性结合受体在静脉内皮细胞上表达^[9-10]。本实验光镜观察发现,A组静脉壁IH及胶原纤维沉积比B、C组严重,且扫描电镜结果显示A组EC损伤程度随血栓形成病程进行性增大,说明如只予抗凝治疗无法阻止静脉内皮及平滑肌细胞遭到进一步的损伤。

急性血栓所引起的血管壁急性炎症反应迅速而强烈。本实验中显示大剂量尿激酶能迅速溶解血栓防止且局部作用持久,可以减轻内膜损伤和血栓机化所致内膜增生^[11]。在平滑肌细胞增生和胶原纤维沉积上尿激酶组明显轻于肝素组。说明尿激酶不仅有溶栓作用,而且能减轻血栓引起的血管壁急性炎症反应^[12-13]。尿激酶联

合肝素治疗急性腔静脉血栓形成即可溶解现有血栓,减轻血管壁急性炎症反应;又能通过肝素的抗凝作用,控制血栓向周边蔓延的可能,因此对血管内皮细胞破坏较小,用于治疗大鼠下腔静脉血栓形成后28 d,内皮修复较好,损伤多为I~II级,血管壁结构基本完整。本实验证实尿激酶联合肝素治疗大鼠急性下腔静脉血栓形成:(1)具有良好的近、中期效果;(2)具有较好的内皮结构保护作用。

参考文献:

- [1] Cho JS, Martelli E, Mozes G, *et al.* Effect of thrombolysis and venous thrombectomy on valvular competence, thrombogenicity, morphology, and function [J]. *J Vasc Surg*, 1998, 28(5): 787-799.
- [2] Segal JB, Streiff MB, Hofmann LV, *et al.* Management of venous thromboembolism: a systematic review for a practice guideline [J]. *Ann Intern Med*, 2007, 146(3): 211-222.
- [3] Cynamon J, Stein EG, Dym RJ, *et al.* A new method for aggressive management of deep vein thrombosis: retrospective study of the power pulse technique [J]. *J Vasc Interv Radiol*, 2006, 17(6): 1043-1049.
- [4] Bautista LE. Inflammation, endothelial dysfunction, and the risk of high blood pressure: epidemiologic and biological evidence [J]. *J Hum Hypertens*, 2003, 17(4): 223-230.
- [5] Anferson TL. Nitric oxide, atherosclerosis and the clinical relevance of endothelial dysfunction [J]. *Heart Fail Rev*, 2003, 8(1): 71-86.
- [6] Davis MR, Ortegon DP, Kerby JD, *et al.* Endothelial dysfunction after arterial thrombolysis is ameliorated by L-arginine in combination with thrombolysis [J]. *Vasc Interv Radiol*, 2003, 14(2): 233-239.
- [7] Garcia DA, Spyropoulos AC. Update in the treatment of venous thromboembolism [J]. *Semin Respir Crit Care Med*, 2008, 29(1): 40-46.
- [8] 刘喜才,宋清斌,张灿刚. ET-1, cmy-c 在自体静脉移植血管内膜增殖表达意义 [J]. *中国普通外科杂志*, 2005, 14(7): 542-543.
- [9] Buller HR, Agnelli G, Hull RD, *et al.* Antithrombotic therapy for venous thromboembolic disease: the Seventh ACCP Conference on Antithrombotic and Thrombolytic Therapy [J]. *Chest*. 2004, 126(3): 401S-428S.
- [10] David O, Josh T, Hanako M, *et al.* Duration of Anticoagulation Following Venous Thromboembolism [J]. *JAMA*. 2005; 294(6): 706-715.
- [11] Kim HS, Preece SR, Black JH, *et al.* Safety of catheter-directed thrombolysis for deep venous thrombosis in cancer patients [J]. *J Vasc Surg*, 2008, 47(2): 388-394.
- [12] Thomas WW, Robert MS, Carol AW, *et al.* Venous thrombosis associated inflammation and attenuation with neutralizing antibodies to cytokines and adhesion molecules [J]. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 1995, 15(2): 258-268.
- [13] Patel VP, Bong M, Di Cesare PE. Heparin-induced thrombocytopenia and thrombosis [J]. *Am J Orthop*, 2007, 36(5): 255-260.